دراسة تشريحية لمراحل نشوء وتطور البراعم العرضية من الاجزاء الزهرية لصنفين من نخيل التمر (*Phoenix dactylifera* L.) المزروعة خارج الجسم الحي

صالح محسن بدر* مكي علوان الخفاجي** حسام سعد الدين محمد**

الملخص

أجريت هذه الدراسة التشريحية بهدف توضيح مراحل نشوء وتطور البراعم العرضية وتحديد مواقع نشوئها من الاجزاء الزهرية لصنفي نخيل التمر (*Phoenix dactylifera* L.) برحي ومكتوم المزروعة خارج الجسم الحي. استؤصلت الشماريخ الزهرية بثلاث مراحل تطورية من أشجار بالغة لصنفي الدراسة وأخذت عينات من الأنسجة النباتية المزروعة في أوساط نشوء وتطور البراعم العرضية بعد مرور المدد الزمنية: 0، 3، 6، 9، 12، 15، 18، 21 و24 أسبوعاً على الزراعة، تم تقطيع هذه الأجزاء إلى شرائح رقيقة وصبغها وفحصها تحت المجهرالضوئي. أظهرت النتائج ان نسيج الكالس الاولي قد استحث تكوينه من النسيج المرستيمي للمبادئ الزهرية للمرحلة التطورية المبكرة اما المرحلتان الثانية والثالثة فقد كانت مبادئ الكرابل ومبادئ الاسدية منطلقاً لنشوئه وان المراكز المرستيمية النشطة في المنطقة المحيطة من كتلة الكالس المتكون هي المسؤولة عن تكوين البراعم العرضية الاولية. كما اوضحت النتائج ان البراعم العرضية قد نشأت مباشرةً من المبادئ الزهرية وذلك نتيجة لفقدان الخلايا البرنكيمية المكونة لبادئات الكرابل في المرحلة التطورية الثانية للمبادئ الزهرية تمايزها وتحولها الى خلايا مرستيمية أعادت تمايزها الى قبب مرستيمية وبادئات اوراق مكونة بادئات البراعم التي تطورت لاحقاً الى براعم خضرية مشابهة لتلك الموجودة في آباط الاوراق.

المقدمة

نخيل التمر (*Phoenix dactylifera* L.) هي أشجار وحيدة الفلقة. ثنائية المسكن. تنتشر زراعتها في الشرق الأوسط وشمالي أفريقيا وتحتل موقعا متميزاً لما تمتاز به من قيمة اقتصادية وغذائية وجمالية وتاريخية واجتماعية. يتم إكثار النخيل تقليدياً أما بالبذور أو بالفسائل، وبسبب عدم التجانس الوراثي للنخيل فأن النباتات الناتجة من زراعة البذور تكون غير مطابقة للصنف وفي معظم الأحوال تكون رديئة النوعية وتعطي أشجاراً مذكرة بنسبة 50% تقريباً (5). أما الإكثار بالفسائل فهو الطريقة المثلى، لكن الإعداد التي يمكن الحصول عليها من الفسائل قليلة وخاصة في الأصناف المرغوبة والنادرة وبذلك فأنها لا تلبي الحاجة للحصول على أعداد كبيرة من الفسائل وإنشاء بساتين النخيل ولذلك استخدمت تقنية زراعة الأنسجة النباتية كطريقة مساندة للإكثار بالفسائل إضافة إلى أنها طريقة علمية دقيقة ولها مزايا كثيرة ويمكن أن تلبي الحاجة إلى أعداد النخيل المطلوبة. لقد لجأ الباحثون في العقود الثلاثة المنصرمة إلى استخدام أجزاء نباتية متنوعة لتحقيق هذا الغرض، ويعد البرعم الطرفي **Terminal Bud** والبراعم الابطية **Auxillary buds** وأنسجة الجمار **Mantle Meristem** وبادئات الأوراق **Leaf primordia** ومن فسائل بعمر (**3 – 4** سنوات) من أكثر الأجزاء النباتية استخداماً وشيوعاً في برامج الإكثار (**15**). وقد اتجه بعض الباحثين إلى دراسة إمكانية استخدام الشماريخ **Spikes** الموجودة ضمن النورة الزهرية **Inflorescence** للنخيل كمصدر بديل للأجزاء المزروعة والمستأصلة من قلب الفسيلة إذ تمتاز هذه الطريقة بعدم تسبب أي ضرر للشجرة الأم فضلاً عن وفرة مصدر الأجزاء النباتية إضافة إلى كونها تفتح آفاقا جديدة لإنقاذ وإكثار الأصناف الجيدة والمهددة

جزء من أطروحة دكتوراه للباحث الثالث.

* الهيئة العامة للبحوث الزراعية– وزارة الزراعة – بغداد، العراق.

** كلية الزراعة– جامعة بغداد– بغداد، العراق.

بالانقراض، وقد أشار العديد من الباحثين الى اهمية المرحلة التطورية للمبادئ الزهرية المحمولة على الشماريخ عند زراعتها في الوسط الغذائي في تحديد نمط تطورها وأمكانية تحولها من الحالة الزهرية الى الحالة الخضرية (**2**، **3**). وفي العراق تم التوصل الى برنامج متكامل للإكثار الدقيق لصنفين من نخيل التمرهما برحي ومكتوم بأستخدام الشماريخ الأنثوية غير الناضجة وبطريقتين هما توالد الأفرع من أنسجة الكالس المتكون من الشماريخ الزهرية أو تكوين الأعضاء مباشرةً من هذه الشماريخ، وبغية توضيح هذه العملية وتحديد المرحلة التطورية الملائمة للتحول على المستوى التشريحي فقد هدفت هذه الدراسة إلى أجراء دراسة تشريحية لتوضيح المراحل المختلفة لتكوين الاعضاء سواء كان ذلك بشكل غير مباشر من خلال تكوين أنسجة الكالس وتوالد الأفرع الخضرية منها أو من خلال تحول الأجزاء الزهرية مباشرةً إلى الحالة الخضرية وتكوين البراعم العرضية (الخضرية) التي تعد النواة الأولى للأكثار السلالي الواسع لنخيل التمر.

المواد وطرائق البحث

زراعة الأجزاء الزهرية خارج الجسم الحي

تم اختيار أشجار بعمر **15** سنة من الصنفين برحي **Barhi** ومكتوم **Maktom** من أحدى البساتين الأهلية في قضاء الصويرة بمحافظة واسط. أخذت الطلعات **Spathes** الحاوية على الشماريخ الزهرية غير البالغة من الأشجار التي تم اختيارها كمصدر للأجزاء النباتية خلال الأسبوع الثاني من شهر شباط. عقمت الطلعات بطول **8–10**سم بوضعها في محلول كلوريد الزئبق $HgCl_2$ بتركيز **0.1**% لمدة عشر دقائق. ثم غسلت الأجزاء النباتية ثلاث مرات بالماء المقطر المعقم. ونقلت الى منضدة انسياب الهواء الطبقي ووضعت في أطباق بتري معقمة، وتمت إزالة غلاف الطلعة واستؤصلت الشماريخ الزهرية **Spikes** من داخله بعناية ونقلت الى أطباق جديدة اذ تم تقسيمها الى قطع بطول **0.5** سم وزراعتها في وسط غذائي مكون من مجموعة الأملاح اللاعضوية الكبرى والصغرى لوسط **MS** (**11**) مضافاً أليه بالملغم/لتر (**HCl–Thiamine1.0**، **1.0 Pyridoxine –HCl**، **Nicotinic acid 1.0** و**Glycin 2.0**، **50** كبريتات الادنين، **Myo-inositol 100**، **$KH_2PO_4.2H_2O$ 170**، **Glutamine 200**، **30000** سكروز، **2000** فحم نباتي فعال، **100**مايكرومول **2,4-D** (**2,4-**) **dichlorophenoxyaceticacid** و**15.0** مايكرومول **2ip** (**N^6–isopentenyl adnine**) كوسط تكوين الكالس. تم تكوين أنسجة الكالس من الأجزاء الزهرية بعد **12** اسبوعاً من التحضين في الظلام بدرجة حرارة 27± **1**. بعدها نقلت الى الضوء حيث تم الحصول على البراعم العرضية والأفرع بعد **12** أسبوعاً من الزراعة في وسط غذائي مجهز **10.0** مايكرومول **2ip** و**5.0** مايكرومول من **NAA** (**Naphthalene acetic acid**). أما لتكوين الأعضاء المباشر فقد أخذت الطلعات بطول **18–20**سم وزرعت قطع الشماريخ الزهرية في وسط **MS** المجهز بتراكيز مختلفة من **BA** (**Benzyladnine**) و**NAA** مع **131.5** مللي مول سكروز وحضنت الزروعات في الظلام لمدة **24** أسبوعاً قبل نقلها الى الضوء بشدة ضوئية مقدراها **1000** لوكس ولمدة **16** ساعة تعقبها **8** ساعات ظلام يومياً وبدرجة حرارة **27±1**م ولمدة **4** أسابيع.

المقاطع التشريحية

عملت المقاطع التشريحية استناداً إلى **Johanson** (**9**) مع إجراء بعض التحويرات وكما يأتي:

تحضير الأجزاء النباتية

استؤصلت الطلعات الزهرية بثلاث مراحل تطورية وقد اعتمد الطول كمعيار للمرحلة التطورية وكما هو موضح في جدول (**1**).

جدول 1: المراحل التطورية للأجزاء الزهرية المستخدمة في الدراسة

المرحلة	طول الطلعة (سم)	طول الشماريخ (سم)	طول المبادئ الزهرية (ملم)
المرحلة الاولى	10–8	5–3	0.22
المرحلةالثانية	20–18	8–6	0.50
المرحلة الثالثة	30–28	14–12	0.76

تم استخراج الشماريخ الزهرية من الطلعات واستؤصلت المبادئ الزهرية من الشماريخ وكذلك تم أخذ الأجزاء النباتية المزروعة التابعة لصنفي الدراسة برحي ومكتوم في الوسط الغذائي إذ أخذت عينات من تلك الأنسجة بعد مرور المدد الأتية: 0، 3، 6، 9، 12، 15، 18، 21 و24 أسبوعاً من الزراعة وقد اعتبر العمر صفر بمثابة النسيج الأولي قبل الزراعة.

القتل والتثبيت Killing and Fixation

وضعت النماذج في المحلول المثبت Formaline Aceto Alcohol (FAA) لغرض قتل وتثبيت هذه النماذج. وتكوّن هذا المحلول من 90 سم^3 من الكحول الأثيلي تركيز 70% و 5 سم^3 من حامض الخليك الثلجي و 5 سم^3 من الفورمالين بتركيز 35%. تركت النماذج في المحلول لمدة 24 ساعة ثم غسلت بالكحول الاثيلي تركيز 50% مرتين الاولى لمدة ساعة والأخرى لمدة 18 ساعة وذلك للتخلص من أثار المحلول المثبت (9).

سحب الماء Dehydration

تم سحب الماء من العينات عن طريق امرارها بسلسلة من تراكيز الكحولات وكما مبين في الجدول (2)، تركت النماذج في الكحول لمدة ساعة لكل خطوة. وقد أعيدت الخطوة الأخيرة مرتين الأولى لمدة ساعة والثانية بقيت النماذج في الكحول لمدة 18 ساعة (9).

الترشيح والترويق Infiltration and Clearing

بعد اكتمال سحب الماء من النماذج نقلت إلى الزايلين، الذي يعد سائلاً مذيباً للبرافين، وتركت فيه لمدة 30 دقيقة ثم جرى تغييره بعدها لمرتين الأولى بقيت النماذج لمدة ساعة وفي المرة الثانية تركت لمدة 18 ساعة إلى أن أصبحت النماذج رائقة شفافة (9).

جدول 2: خطوات سحب الماء من النماذج النباتية

الخطوة	ماء مقطر (مل)	كحول اثيلي بتركيز 95% (مل)	كحول البيوتيل الثلاثي (TBA) (مل)	كحول اثيلي بتركيز 100% (مل)	التركيز التقريبي الكلي في المحلول (%)
1	50	40	10	–	50
2	30	50	20	–	70
3	15	50	35	–	85
4	–	45	50	–	95
5	–	–	75	25	100
6	–	–	100	–	100

الطمر بالبرافين Embedding

اضيف مبروش شمع البرافين (درجة انصهاره 60–65°م) بصورة تدريجية إلى الزايلين مع التحريك المستمر حتى أذابته تماماً ووضعت النماذج فيه لمدة 24 ساعة. ثم نقلت إلى الشمع النقي المنصهر والذي اذيب في فرن كهربائي بدرجة 65–68°م. وتركت النماذج في الشمع المذاب لمدة يومين، تم خلالها تبديل الشمع لمرتين، جرى بعد ذلك طمر النماذج في الشمع داخل قوالب خاصة إذ تم تحديد الاتجاه المطلوب للنماذج وجرى تبريد القوالب بالماء البارد لغرض تصلب الشمع بسرعة لضمان تجانسه في أثناء التصلب (9).

التقطيع الدقيق والتحميل Microtoming and loading

هيئت القوالب الحاوية على النماذج بشكل مكعبات منتظمة تحتوي على النموذج في مركزها وثبت القالب في المكان المخصص له في جهاز التقطيع الدقيق **(Microtome)** نوع **MSE** وأجريت عملية التقطيع الدقيق بسمك **12** مايكرون للشريحة الواحدة. رتبت الأشرطة المتكونة من عملية التقطيع حسب التسلسل. وجرى تقطيع هذه الأشرطة إلى قطع بأطوال **5** سم. ولغرض تثبيت المقاطع على الشرائح الزجاجية، وضعت قطرة من زلال ماير **(Myer's albumin)** على الشريحة الزجاجية وجرى توزيعها بشكل جيد على الشريحة من خلال مسحها بإصبع اليد . تم وضع بضع قطرات من الماء المقطر فوق طبقة الزلال. ونقلت الأشرطة إلى الشريحة لتطفو فوق طبقة الماء، ووضعت الشرائح على صفيحة حارة **(Hot plate)** بدرجة حرارة حوالي **35**°م وجرى تنظيم الأشرطة على سطح الشريحة، وتركت الشرائح الزجاجية على الصفيحة الحارة لحين تبخر الماء تماماً والتصاق النماذج على الشرائح.

إزالة الشمع وإعادة الماء إلى النماذج والتصبيغ Dewaxing , hydration and staining

لغرض التخلص من الشمع تم وضع الشرائح في مخبار كوبلن **Coplin jar** مملوء بالزايلين لمدة ساعة. ثم نقلت الشرائح إلى مخبار أخر ولمدة ساعة. ثم نقلت الشرائح إلى مخبار أخر ولمدة ساعة أيضا للتأكد من إزالة الشمع تماماً ولإعادة الماء إلى النماذج وضعت الشرائح الزجاجية في مخبار كوبلن يحتوي على كحول اثيلي بتراكيز تنازلية ابتداءً من الكحول المطلق وحتى التركيز **50%** وكالآتي: **100، 95، 90، 80، 70 و50%** ولمدة **15** دقيقة لكل تركيز. بعد ذلك جرى نقل الشرائح إلى مخبار كوبلن يحتوي على صبغة السفرانين المحضر بإذابة الصبغة في **100** سم^3 من الكحول الاثيلي **50%** وتركت الشرائح في الصبغة لمدة **18** ساعة. ولأجل أزالة الصبغة الزائدة نقلت الشرائح إلى مخبار كوبلن يحتوي على كحول اثيلي بتركيز **50%**.

سحب الماء والترويق والتحميل Dehydration, Clearing and loading

لأجل سحب الماء من النماذج بعد تصبيغها نقلت الشرائح إلى مخابر كوبلن تحتوي على تراكيز تصاعدية من الكحول الاثيلي (**70، 80، 90، 95 و100%**) ولمدة خمس دقائق في كل تركيز. بعد ذلك وضعت الشرائح في الزايلين النقي ولمدة عشر دقائق لغرض الترويق، ثم وضعت الشرائح على ورق النشاف لسحب الزايلين منها ثم وضعت قطرة من بلسم كندا **Canada balsam** فوق النماذج وغطيت بغطاء الشريحة الزجاجية **Cover slide**، ووضعت على الصفيحة الحارة لجفاف البلسم، وبذلك أصبحت الشريحة الزجاجية دائمية ويمكن حفظها لمدة طويلة ثم جرى بعد ذلك فحصها وتصويرها وحفظت الصور لتحليل النتائج.

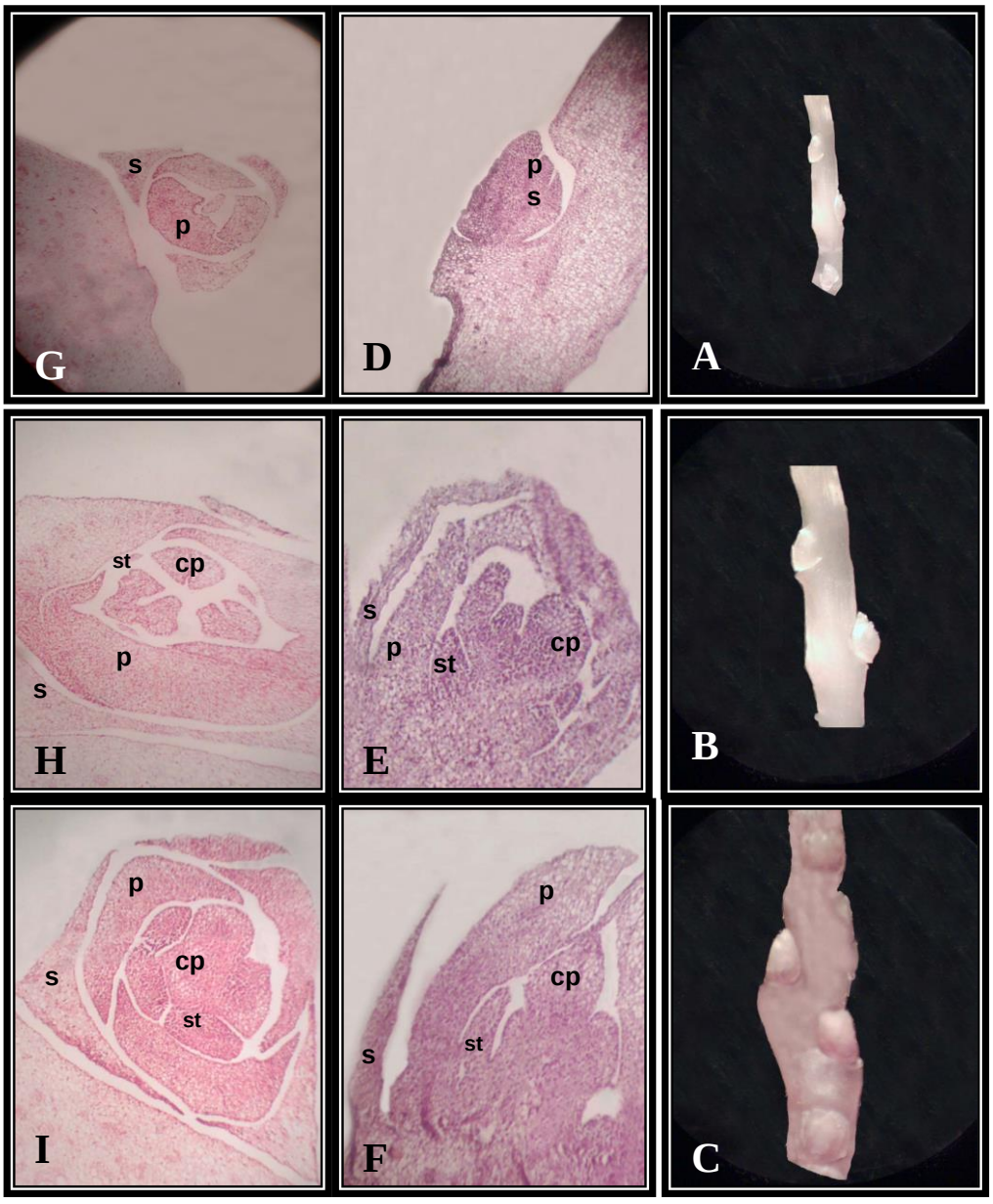
النتائج والمناقشة

أظهرت النتائج كفاءة التقانة المتبعة في الدراسة الحالية من حيث تثبيت النماذج وسحب الماء منها وطمرها بالبرافين وعمل القطاعات وتصبيغها، إذ تم الحصول على شرائح واضحة امكن من خلالها تحديد مواقع نشوء انسجة الكالس وتكوين البراعم العرضية منه للأجزاء الزهرية وكذلك نشوء البراعم العرضية مباشرة من هذه الاجزاء وبدون المرور بمرحلة الكالس وكما يأتي:

المرحلة التطورية للأجزاء الزهرية المستخدمة في الاكثار

يوضح الشكل (**1**) مقاطع تشريحية للمبادئ الزهرية للصنف برحي في العمر صفر (قبيل الزراعة خارج الجسم الحي) وللمراحل التطورية الثلاث قيد الدراسة، أذ يوضح الشكل (**D–1** و**G**) المقطعين الطولي والعرضي للمبادئ الزهرية بطول **0.22** ملم المحمولة على الشماريخ بطول **3–5** والمستأصلة من طلعات بطول **8–10**سم، ويتضح منها بداية نشوء الاغلفة الزهرية وهي مبادئ الاوراق الكأسية **Sepals primordia (S)** الثلاث اولاً وتكون على هيئة

كوكبة مفردة **Whorl** وفي مستوى واحد، وتنشأ بعدها مبادئ الاوراق التويجية **Petals primordia (p)** بصورة متعاقبة في الموقع. اما مبادئ الأسدية **Stamens primordia (st)** فتنشأ بشكل كوكبتين كل واحدة مكونة من ثلاث أسدية الاولى في مقابل الاوراق الكأسية **antesepalous** والثانية في مقابل الاوراق التويجية **antepetalous** والتي تظهر واضحة في الشكل (**H,E-1**) اللذان يمثلان المبادئ الزهرية بطول **0.50** ملم المأخوذة من شماريخ بطول **6–8**سم والمستأصلة من طلعات بطول **18–20**سم. ويلاحظ من هذه المقاطع كذلك مبادئ الكرابل **Carpel primardia (cp)** والتي تظهر في مركز او قمة الزهرة **Floral apex** وبشكل



شكل **1**: يمثل المراحل التطورية للشماريخ الزهرية قيد الدراسة, المقاطع **F**، **E** و**D** مقاطع طولية, **I**، **H** و**G** مقاطع عرضية: **s** بادئات الاوراق الكأسية **p** مبادئ الاوراق التويجية **st** مبادئ الأسدية **cp** مبادئ الكرابل, قوة التكبير **100** مرة. طول المبادئ الزهرية **D** و**G** **0.22** ملم، **E** و**H** **0.5** ملم و**F** و**I** **0.76** ملم.

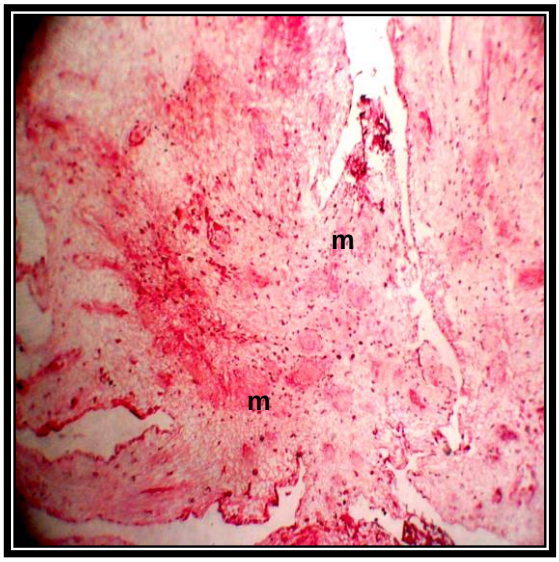
حدبة مدورة متطاولة ويبدأ نشوء مجموعة الكرابل الثلاثة **Gynoecium** كمنطقة مسطحة مثلثة الشكل في قمة الزهرة. ثم يستمر تقسيم المركز الى ثلاثة اجسام مدورة صغيرة لتصبح فيما بعد الجدران الفاصلة بين الكرابل الثلاث في الزهرة.

وبأستمرار نمو وتطور مبادئ الكرابل الى الاعلى يصبح الاختلاف في حجم الأسدية والكرابل واضحاً حيث تكون مبادئ الكرابل في الازهارالانثوية اكبر واكثر استدارة كما هو موضح في الشكل (**I,F-1**) الذي يمثل مقاطع للمبادئ الزهرية الانثوية بطول **0.76** ملم المحمولة على شماريخ بطول **12–14**سم والمستأصلة من طلعات بطول (**28–30**سم). يتضح مما سبق ان زهرة النخيل تكون خنثية في المراحل المبكرة من تطورها نظراً الى تطور مبادئ الأسدية والكرابل بشكل متزامن في المراحل الاولى. وتتفق النتائج المستحصل عليها من هذه المقاطع التشريحية مع ما توصل اليه **DeMason** وجماعته (**8**) في دراستهم التكوين الزهري في نخيل التمر صنف دكلة نور في كاليفورنيا بأستخدام المقاطع التشريحية وصور المجهر الالكتروني.

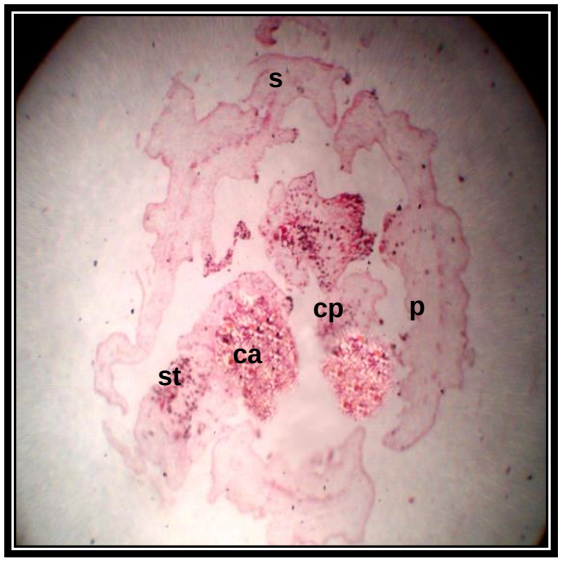
استحثاث انسجة الكالس من الاجزاء الزهرية المزروعة

لقد اوضحت نتائج المقاطع التشريحية ان استحثاث انسجة الكالس الاولي **Initial callus** قد تم من اجزاء زهرية مختلفة بالاعتماد على المرحلة التطورية للمبادئ الزهرية، فقد نشأت خلايا الكالس هذه من النسيج المرستيمي للمبادئ الزهرية في المرحلة التطورية المبكرة (شكل **2**)، اما المرحلة التطورية الثانية والمرحلة الثالثة فأن مبادئ الكرابل **(cp)** ومبادئ الأسدية **(st)** كانت منطلقاً لنشوئه وكما هو موضح في الشكل (**3**)، فقد أشارت الملاحظات التشريحية والصور المأخوذة من المقاطع المكبرة في منطقة النسيج المرستيمي للمبادئ الزهرية الى وجود الخلايا المرستيمية النشطة **Meristematic cells** ذات القدرة السريعة على الانقسام والمتميزة بحجمها الصغير وكبر نواتها واحتوائها على نوية بارزة او نويتين وعلى سايتوبلازم كثيف (غنية بالسايتوبلازم) وتقل او تنعدم فيه الفجوات وميلها للاصطباغ بصبغات داكنة **Darkly Stained** وتراصفها الشديد مع بعضها (اي قلة او انعدام وجود المسافات البينية فيما بينها) ويتركز وجود تلك الخلايا في مركز المبادئ الزهرية حيث يؤدي نشاطها الى تكوين مبادئ الاغلفة والاعضاء الزهرية، وبعد مرور ثلاثة اسابيع على زراعة هذه المبادئ والمحمولة على الشماريخ الزهرية في اوساط غذائية مجهزة بتراكيز عالية من الاوكسين **2,4-D** ومنخفضة من السايتوكاينين **2ip** مع وجود **PVP** وفي الظلام المستمر فأن هناك تغيرات معينة طرأت في شكل وحجم الجزء المزروع **Explant** وكما تم توضيحه سابقاً.

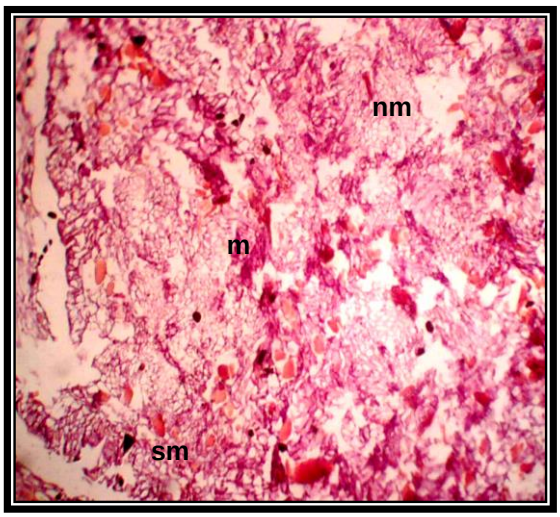
وعلى المستوى التشريحي فقد رافق تلك التغيرات زيادة في نشاط خلايا النسيج المرستيمي للمبادئ الزهرية (شكل **2**) مما ادى الى زيادة بالانقسام والاستطالة وبالتالي زيادة حجم الاغلفة الزهرية وتفتحها في الوسط الغذائي، وفضلاً عن هذه التغيرات فقد ظهر في هذه المرحلة وبعد **6** اسابيع من الزراعة نمو خلوي آخر في وسط المبادئ الزهرية تمثل بشكل كتلة من خلايا مختلفة الاشكال والاحجام فمنها خلايا مرستيمية (**m**) وهي قليلة جداً وتميزت بتفككها بعضها عن بعض وبكونها هشة **Friable** سهلة الانفصال وقليل منها شبه مرستيمية (**sm**) **Semi-meristematic cells** وهي خلايا أقل نشاطاً في النمو مع زيادة في حجمها وصغر في حجم نواتها وقلة في كثافة سايتوبلازمها وظهور الفجوات بصورة جزئية فيها، أما معظمها فكانت متطاولة الشكل**Elongated cells** غير مرستيمية (**nm**)-**meristematic Non** وتميزت بكونها غير نشطة النمو وكبيرة الحجم ذات نوى صغيرة جداً أو غير مرئية (يصعب مشاهدتها تحت المجهر) وتحتوي على كميات قليلة جداً من السايتوبلازم (فقيرة السايتوبلازم) وتكثر فيها الفجوات الكبيرة التي تكاد تملأ حجم الخلية (شكل **4**) ولقد عدت هذه المرحلة من نشوء نسيج الكالس الاولى بعد مضي **6** اسابيع على الزراعة كمرحة كالسية مرستيمية اولية **Callomeristematic**



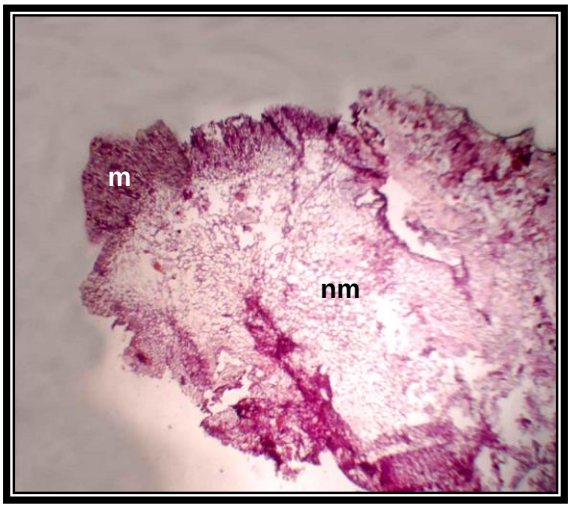
شكل 2 : مقطع طولي لبادئة زهرية للصنف مكتوم بعد 3 أسابيع من الزراعة في وسط مجهز 2,4-D ويلاحظ النسيج المرستيمي للمبادئ والمراكز المرستيمية النشطة (m) قوة التكبير 50 مرة.



شكل 3: تكون أنسجة الكالس (ca) من مبادئ الكرابل (cp) ومبادئ الأسدية (st) لبادئة زهرية بطول 0.5 ملم للصنف مكتوم بعد 6 أسابيع من الزراعة في وسط مجهز بالاوكسين 2,4-D (s) مبادئ الأوراق الكاسية (p) مبادئ الأوراق التويجية قوة التكبير 40 مرة.



شكل 4: مقطع عرضي من نسيج الكالس الأولي بعد 6 أسابيع من الزراعة في وسط مجهز2,4-D ويلاحظ وجود ثلاثة انواع من الخلايا الكالسية: (m) مرستيمية، (sm) شبه مرستيمية و(nm) غير مرستيمية ، قوة التكبير 100 مرة.



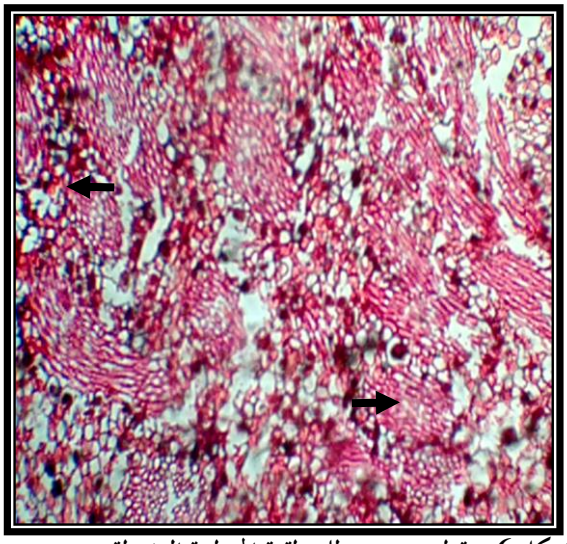
شكل 5 : كتلة كالسية متكونة من بادئة زهرية للصنف مكتوم بعد 9 أسابع من الزراعة ويلاحظ الخلايا المرستيمية النشطة في محيط الكتلة والخلايا غير المرستيمية في وسط الكتلة (m) مرستيمية و(nm) غير مرستيمية قوة التكبير 40 مرة .

stage أي بعبارة اخرى مرحلة تمايز Differentiation الخلايا المرستيمية للمبادئ الزهرية ونموها الى كتل وبروزات غير منتظمة الشكل Unorganized growth. محيطها مكون من خلايا مرستيمية وباطنها من خلايا شبه مرستيمية وغير مرستيمية فهذه الكتل والبروزات هي نسيج الكالس البدائي الاولي. اي ان ظهور ما يعرف بالكالس الاولي يبدأ في نهاية هذه المرحلة بعد مرور 6 اسابيع على الزراعة. وبعد مرور 9 اسابيع على زراعة الاجزاء الزهرية على وسط مجهز بتركيز عالٍ من الاوكسين تطورت البروزات المرستيمية السابقة الذكر الى كتل نسيجية كبيرة من كتل الكالس Callus Clumps بعضها اصبح منفصلاً عن الاجزاء الزهرية المزروعة، ويلاحظ ايضاً ان عدم انتظام نمو الكالس قد اشتد في هذه المرحلة واصبحت الكتل النامية طاغية على النسيج الاصلي من ناحية الشكل والحجم، وقد تميزت معظم الخلايا في باطن هذه الكتل الكالسية بكونها غير مرستيمية دائرية الشكل تشبه الخلايا البرنكيمية في القشرة Cortex، بينما تميزت الخلايا في محيط كتل الكالس والبعيدة عن النسيج الاصلي بكونها مرستيمية نشطة شكل (5). وبعد مرور 12 اسبوعاً على زراعة النسيج الاصلي في الوسط الغذائي السابق (وسط اكثار الكالس) تطورت كتل الكالس السابقة الى كتل وتجمعات كالسية اكبر حجماً محاطة بأعداد كبيرة من بروزات مرستيمية تقع تحتها مباشرة وغير المرستيمية البعيدة عند الخلايا المحيطية (الخلايا الوسطية من كتلة الكالس) ويلاحظ في هذه المرحلة وجود تجمعات او انفصالات لبعض الخلايا المرستيمية المحيطية وتحت المحيطية في البروزات مرستيمية بشكل مراكز مرستيمية بدائية مستقلة عند بعضها عادة تتخذ اشكالاً كروية او متطاولة كما في الشكل (6). واخذت هذه المراكز تتضح اكثر في نهاية هذه المرحلة بتكوينها جدراناً خلوية سميكة تحيط بكل مركز مرستيمي منفصل عن الانسجة الاخرى او المراكز الاخرى المجاورة له او المحيطة به.

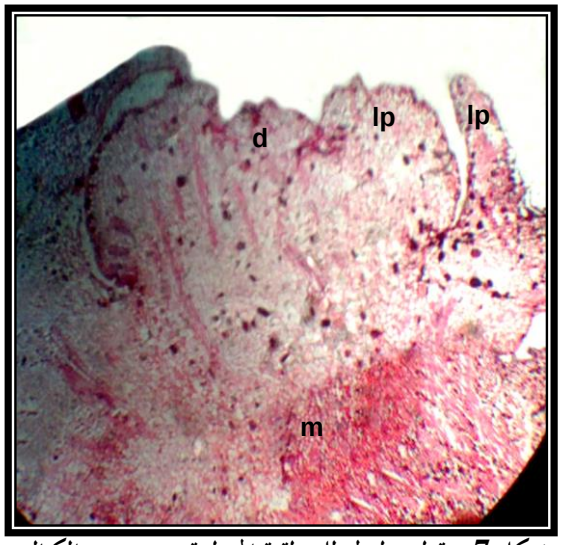
يتضح من النتائج أعلاه أن الخلايا البرنكيمية الخاصة بالاعضاء والاغلفة الزهرية لم تفقد قدرتها على الانقسام اي قابليتهاالمرستيمية نظراً الى أحتفاظها بمكوناتها البروتوبلازمية بما في ذلك النواة والسايتوبلازم، ويبدو أن وجود الأوكسين في الوسط الغذائي كان ضرورياً في احداث هذا التغيير الجوهري في نمط التطور الفسيولوجي والشكلي لهذه الخلايا وشروعها بالأنقسام. أن عمل الأوكسين في اعادة برمجة نمط التطور للخلايا التي تم تمايزها بالرجوع لإعادة التمايز Dedifferentiation قد وجد انه يتم من خلال زيادة مستوى مثيلة الدنا DNA methylation في النواة، وأن جزءاً من هذه الخلايا في النهاية يكتسب القدرة على تكوين الأعضاء والأجنة (10).

تكوين البراعم العرضية من انسجة الكالس

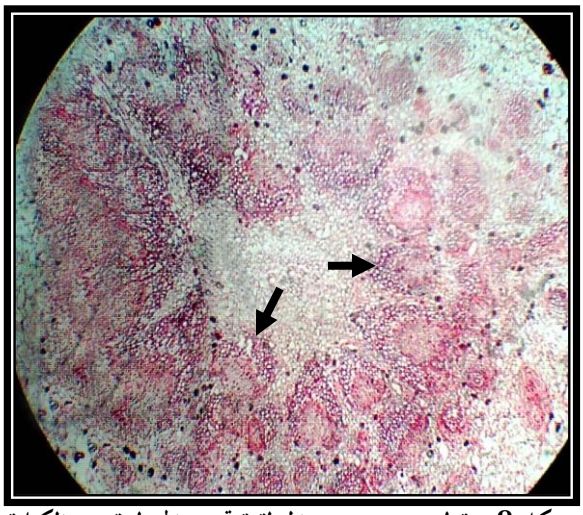
بعد مرور 12 اسبوعاً على زراعة الاجزاء النباتية الزهرية الأصلية Explants نقل الكالس المتكون في اوساط مجهزة بتراكيز عالية من الاوكسين وواطئة من السايتوكاينين وفي الظلام الى اوساط جديدة مجهزة بتراكيز عالية من السايتوكاينين 2ip وواطئة من الاوكسين NAA وفي الضوء. وبعد 3 اسابيع (15 اسبوعاً من زراعة النسيج الأصلي)، أوضحت المقاطع التشريحية زيادة حجم قطع الكالس المنقول كنتيجة لأنقسام واستطالة الخلايا الناتجة من المراكز المرستيمية المنتشرة في خلايا الطبقة المحيطية لكتل الكالس، وبعد مرور 6 اسابيع على النقل الى الاوساط الجديدة (18 اسبوعاً من زراعة النسيج الأصلي) لوحظ تمايز بعض الخلايا الناتجة من نشاط المراكز المرستيمية الموجودة في الطبقة المحيطية من كتل الكالس الى تراكيب تشبه الوريقات الصغيرة تحيط بمنطقة تشبه القبة (d) مكونة من خلايا مرستيمية كثيفة السايتوبلازم (شكل 7) وتشكل هذه المناطق التي انتشرت في الطبقة المحيطية من الكالس أوليات البراعم Bud initials وتكون منتشرة على سطح قطع الكالس المزروعة، ولقد احتوت العديد من هذه الكتل على حلقات ذات طبيعة مرستيمية داخل الكتلة الكالسية. وتقع تحت المنطقة المحيطية وتفصلها عن محيط كتلة الكالس منطقة خلايا غير مرستيمية وتميزت الحلقات بكونها داكنة اللون مكونة مجموعات من خلايا مرستيمية غير متصلة بل متقطعة



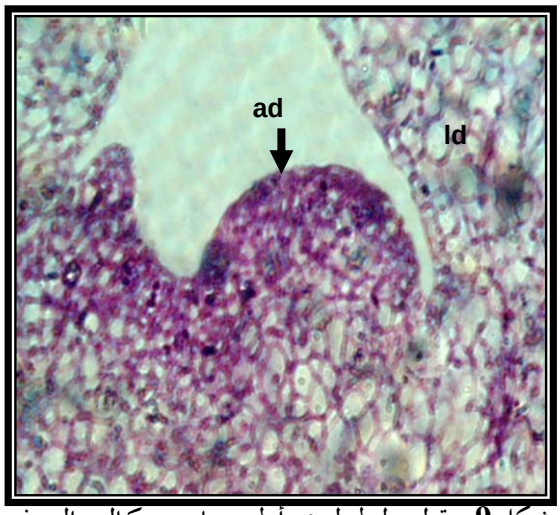
شكل 6: مقطع عرضي للمنطقة المحيطية النشطة من نسيج الكالس بعد 12 أسبوعاً من الزراعة في وسط مجهز 2,4-D ويلاحظ تكون المراكز المرستيمية وإنفصالها عن محيطها وعن بقية المراكز الأخرى، قوة التكبير 100 مرة.



شكل 7: مقطع طولي للمنطقة المحيطية من نسيج الكالس للصنف مكتوم بعد 18 أسبوعاً من الزراعة يوضح نشوء بروزات بشكل مبادئ ورقية (lp) وتحدب (d) نتيجة لنشاط المركز المرستيمي أسفلها (m) قوة التكبير 100 مرة.



شكل 8: مقطع عرضي من المنطقة تحت المحيطية من الكتلة الكالسية يلاحظ فيها نشوء حلقات من خلايا مرستيمية تمثل حزمة وعائية أولية، قوة التكبير 50 مرة.



شكل 9: مقطع طولي لبرعم أولي متمايز من كالس الصنف مكتوم بعد 21 أسبوعاً من الزراعة ويلاحظ استطالة المبادئ الورقية (lp) والقبة المرستيمية (ad) ونشوء بروز جانبي لتكوين برعم جديد قوة التكبير 400 مرة.

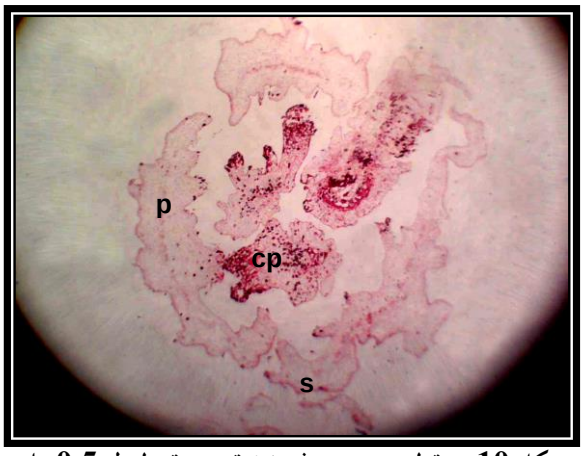
الى مجموعات، ويعتقد بأنها حزم وعائية اولية **Procambial bundles**. اما مركز الحلقة فمكون من خلايا غير مرستيمية (شكل 8). بعد مرور 9 اسابيع على الزراعة في اوساط نشوء البراعم العرضية في الضوء (21 اسبوعاً من زراعة النسيج الأصلي) لوحظت البراعم المتكونة بالعين المجردة بشكل وريقات صغيرة خضراء اللون ومندمجة في كالس الصنف مكتوم حيث دلت المقاطع التشريحية على ازدياد في حجم الوريقات المتكونة وطولها. كما ازدادت اعداد البراعم الأولية المتكونة حيث يوضح الشكل (9) احد هذه البراعم المتكونة من الكالس والمكونة من القبة المرستيمية (ad) ومبادئ الاوراق (lp) **Leaf primordia** وفي ابطها كذلك نشوء بروز جانبي يمثل بداية لقبة مرستيمية ستتطور لاحقاً الى

برعم عرضي آخر ويلاحظ من الشكل كذلك ان الخلايا المكونة لهذه القبة هي خلايا المرستيم الطرفي **Apical meristem** وهي طبقة رقيقة من الخلايا تكون بشكل كتلة محدبة **dome shape** وتكون هذه الطبقة من الخلايا في حالة انقسام وأستطالة مستمرة مما يؤدي الى استطالة البرعم ونموه الى ساق حديثة، وتلاحظ الخلايا البرنكمية لكتلة الكالس اسفل القمة المرستيمية. ان نتائج الدراسة الحالية المتعلقة بأستحثاث الكالس من اجزاء نخلة التمر تتفق مع نتائج بعض الدراسات السابقة (**1**، **5**) في دراساتهم التشريحية لتكوين الكالس والاجنة الجسمية من القمة النامية لأصناف البرحي والحلاوي والساير (**3**) للأجزاء الزهرية للصنف دكلة نور.

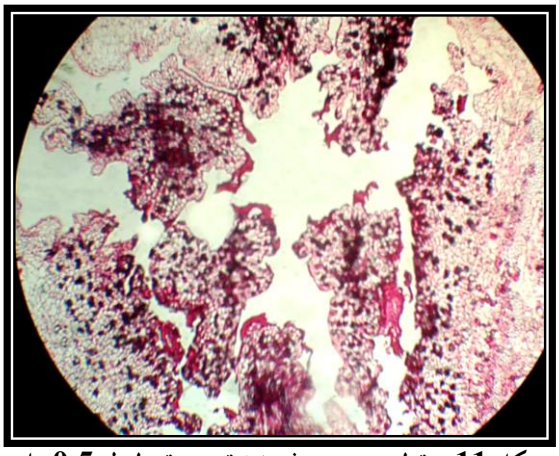
يتضح من نتائج الدراسة الحالية تكون البراعم العرضية من أنسجة الكالس المزروعة في اوساط غذائية تحتوي على تراكيز مختلفة من الأوكسين **NAA** والسايتوكاينين **2ip** وهذا يعزى إلى الدورالذي يؤديه التوازن بين تراكيز هذين النوعين من منظمات النمو في تحديد نمط التمايز الخلوي وتكوين الأعضاء خارج الجسم الحي، إذ يؤدي وجود تراكيز عالية من السايتوكاينينات وواطئة من الأوكسينات في الوسط الغذائي إلى تكوين براعم خضرية تنمو إلى افرع (**14**). وتشير الدراسات الحديثة الى ان الأوكسين يعمل على تحفيز الجينات التي يقوم السايتوكاينين بالسيطرة على تعبيرها الجيني، وان نواتج التعبير الجيني للجينات المنظمة تؤدي دوراً أساسياً في العمليات البيولوجية مثل انقسام الخلايا والتركيب الضوئي وتطور الكلوروبلاست وأيض العناصر المغذية (**12**).

تكوين البراعم العرضية مباشرة من الاجزاء الزهرية

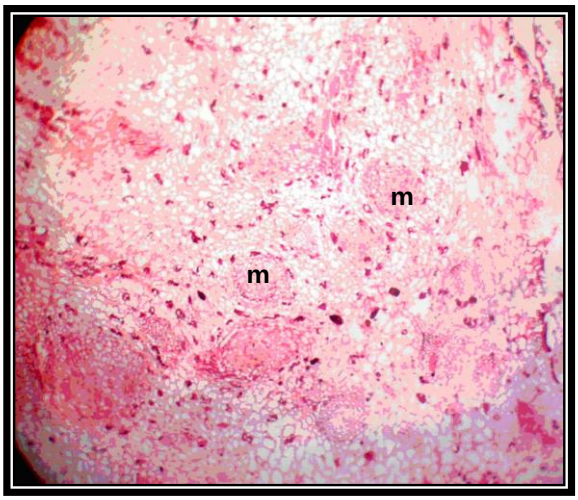
لقد اظهرت المقاطع التشريحية للأجزاء الزهرية في مراحل زمنية متعاقبة من الزراعة خارج الجسم الحي تحول الانسجة الزهرية المزروعة الى الحالة الخضرية وتكوين براعم عرضية بشكل مباشر دون المرور بمرحلة الكالس، إذ تشكل هذه البراعم النواة الأولى للأكثار الخضري لنخلة التمر. وأوضحت هذه المقاطع نشوء البراعم من مبادئ الكرابل التي تتوسط المبادئ الزهرية، فعند زراعة المبادئ الزهرية في الاوساط الغذائية المجهزة بتراكيز عالية من السايتوكاينين وفي الظلام لاحظنا وبعد مرور **6** اسابيع تضخم الاغلفة الزهرية مع تفتحها وذلك نتيجة لنشاط الخلايا المرستيمية في مركز المبادئ الزهري التي يؤدي انقسام خلاياها المستمر واستطالتها الى نمو مبادئ الاغلفة والاعضاء الزهرية وتفتحها في الوسط الغذائي، وبعد مرور **12** اسبوعاً على زراعة النسيج الاصلي يلاحظ من الشكل (**10**)



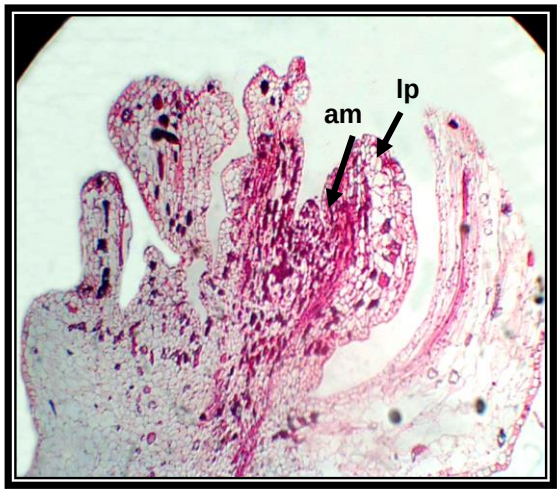
شكل **10** : مقطع عرضي في بادئة زهرية بطول **0.5** ملم للصنف برحي بعد **12** أسبوعاً من الزراعة ويلاحظ تضخم الأغلفة الزهرية وتحول خلايا بادئات الكرابل إلى خلايا مرستيمية نشطة (**s**) أوراق كأسيه (**p**) أوراق تويجية (**cp**) بادئات الكرابل، قوة التكبير **40** مرة.



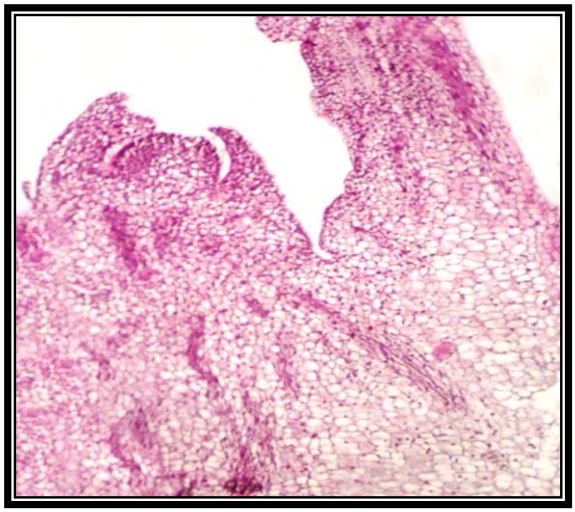
شكل **11**: مقطع عرضي في بادئة زهرية بطول **0.5** ملم للصنف برحي بعد **18** أسبوعاً من الزراعة ويلاحظ تحول أغلب خلايا الكرابل إلى خلايا مرستيمية ، قوة التكبير **100** مرة.



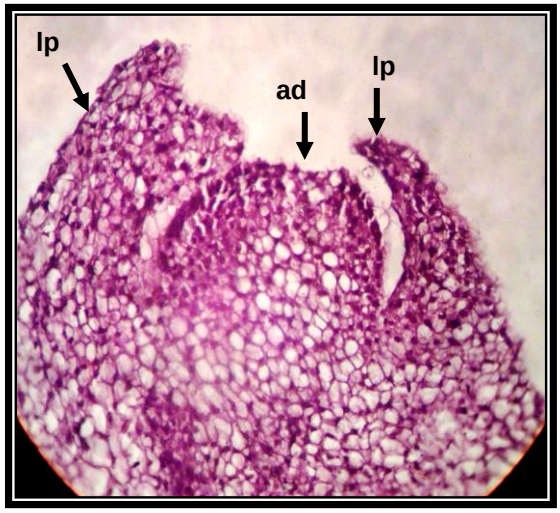
شكل 12 : مقطع عرضي لمبادئ الكرابل المتطورة بعد 18 أسبوعاً من الزراعة ويلاحظ فيها نشوء المراكز المرستيمية (m) وانفصالها عن بقية خلايا النسيج قوة التكبير 100 مرة.



شكل 13 : مقطع طولي لبادئة زهرية للصنف برحي بعد 24 أسبوعاً من الزراعة ويلاحظ تحولها إلى الحالة الخضرية ونشوء بادئات الأوراق (lp) والقمم المرستيمية (am) قوة التكبير 40 مرة.



شكل 14: مقطع طولي لبرعم أولي ناشئ من بادئة زهرية للصنف برحي بعد 24 أسبوعاً من الزراعة قوة التكبير 100 مرة.



شكل 15: مقطع طولي مكبر للبرعم أعلاه يوضح فيه القمة المرستيمية المكونة من القبة المرستيمية (ad) مع زوج من بادئات الأوراق (lp) ، قوة التكبير 400 مرة.

الذي يمثل بادئة زهرية انثوية مأخوذة من شماريخ بطول 5–6 سم ومزروعة على وسط النشوء فيلاحظ تضخم الاغلفة الزهرية وهي مبادئ الاوراق الكأسية ومبادئ الاوراق التويجية في حين يلاحظ أن اغلب خلايا مبادئ الكرابل قد طرأت عليها تغيرات ادت الى فقدان تمايزها وتحولها الى خلايا مرستيمية نشطة وقد اكتسبت اللون الداكن. وبعد مرور 18 اسبوعاً على الزراعة يلاحظ تكون كتلة نسيجية غير متمايزة في وسط المبادئ الزهرية المتفتحة واخذت هذه الكتلة بالزيادة في الحجم بصورة تدريجية وعلى المستوى التشريحي فقد دلت المقاطع على تحول اغلب خلايا مبادئ الكرابل مع بعض خلايا مبادئ الاوراق التويجية الى خلايا مرستيمية (شكل 11) وكذلك نشوء مراكز مرستيمية بدائية مستقلة عن بعضها تتخذ اشكالاً كروية او متطاولة (شكل 12) واخذت هذه المراكز تتضح اكثر في نهاية هذه المدة بتميزها عن الخلايا

الاخرى البرنكيمية الخاصة بمبادئ الكرابل. وبمرور 24 اسبوعاً ونتيجة لنشاط هذه المراكز المرستيمية فأن بعض خلايا المنطقة المحيطية بالكتلة النسيجية قد تمايزت الى تراكيب تشبه الوريقات من ناحية الشكل تحيط ببروزات شكل (13) سرعان ما تحولت الى قبب محدبة مكونة من خلايا مرستيمية كثيفة السايتوبلازم ذات صبغة داكنة (شكلين 14 و15) ونتيجة لنشاط المرستيم الطرفي لهذه المنطقة في الانقسام والاستطالة فان هذه القمم تنمو وتتطور إلى براعم عرضية تنمو لاحقاً الى افرع جديدة. وتتفق النتائج الواردة في هذه الدراسة من حيث تكوين البراعم العرضية مباشرة من الانسجة الزهرية وبالتحديد مبادئ الكرابل مع ما توصل اليه **Drira** و**Benbadis** (7)، دريرة وجماعته (3).

لقد دلت نتائج المقاطع التشريحية على انه على الرغم من تمايز الخلايا المكونة للأنسجة الزهرية الى خلايا برنكيمية خاصة بهذه الاعضاء والاغلفة الزهرية فأنها لم تفقد قدرتها على الانقسام اي قابليتها المرستيمية **Potentially meristematic** نظراً الى أحتفاظها بمكوناتها البروتوبلازمية بما في ذلك النواة والسايتوبلازم حيث مارست هذه الخلايا ما يسمى فقدان التمايز **Dedifferentiation** فتحولت الى خلايا مرستيمية مرة اخرى، إذ ان من المعروف انه يمكن استحثاث خلايا الانسجة المتمايزة على الانقسام الخلوي بوضعها في اوساط غذائية صناعية (6)، وان هذه الخلايا لكي تنقسم لا بد من مرورها اولاً بتغييرات معينة تشمل هذه التغيرات استبدال المكونات الخلوية غير الفعالة المتكونة نتيجة لعمليات الهدم في اثناء مرحلة خمول الخلايا وكذلك بناء بروتينات وأحماض نووية جديدة (4) وان هذه الخلايا قد تمايزت مرة اخرى وبفعل مكونات الوسط الغذائي الى مبادئ الاوراق **Leaf primordial** والبراعم ولكي تتمكن الخلايا من ذلك لا بد من أن تمر بحالة اعادة التمايز **Redifferentiation** حيث تتحول من حالتها المرستيمية (الجنينية) الى الحالة المتمايزة لتكوين انسجة واعضاء واخيراً النبات الكامل. وتشير الأبحاث الخاصة بتكوين الأعضاء خارج الجسم الحي الى أن عملية التحفيز **Induction** لخلايا الجزء النباتي المزروع تنتهي عندما تكتسب هذه الخلايا خاصية معينة يطلق عليها **Canalization** (وتعني خاصية المسارات التطورية لتكوين طرز أو أشكال مظهرية قياسية بالرغم من حدوث اختلال وراثي أو بيئي) وهذا يحدث بفعل بعض العوامل مثل مكونات الوسط الغذائي وظروف التحضين، فضلاً عن كون خلايا الأنسجة المزروعة في مرحلة التطور الفسلجي المناسبة لعملية التحول هذه (13). ولربما لم تكتسب الأجزاء الزهرية المزروعة في هذه الدراسة هذه الخاصية الا في المرحلة التطورية المذكورة آنفاً. بعدها تتمايز هذه الخلايا لتكوين مرستيمات أولية تنمو وتتطور إلى براعم لها التكوين الشكلي **Morphogenesis** نفسه للبراعم الموجودة في آباط الأوراق.

المصادر

1- الموسوي، عبد المنعم حسين علي (1994). دراسة تشريحية لمراحل نشوء وتطور نسيج الكالس الى اجنة خضرية ونباتات كاملة من نخلة التمر المزروعة خارج الجسم الحي. رسالة ماجستير- كلية العلوم- جامعة البصرة- العراق.

2- أبحمان، العربي (1998). استخدام الانسجة الزهرية كأعضاء لأكثار النخيل بالطرق النسيجية. اصدارات الندوة العلمية لبحوث النخيل. مراكش- المملكة المغربية. شباط/ 1998: 256-260.

3- دريرة، نور الدين؛ رجاء الشعري وانيسة المصمودي (1996). تحليل قدرات المبادئ الزهرية الانثوية لنخيل التمور، بواسطة زراعة الانسجة. اصدارت ندوة النخيل الثالثة بالمملكة العربية السعودية 17-20 /كانون الثاني/ 1993م. دار المريخ للنشر. الجزء الاول: 161-170.

4- محمد، عبد المطلب سيد ومبشر صالح عمر (1990). المفاهيم الرئيسة في زراعة الخلايا والانسجة والاعضاء للبنات. جامعة الموصل- العراق.

5- مطر، عبد الامير مهدي (1991). زراعة النخيل وانتاجه. مطبعة دار الحكمة. جامعة البصرة. العراق. 13-157.

6- Dodds, J.H. and J.W. Roberts (1999). Experiments In Plant Tissue Culture. Third Edition. Cambridge University Press. UK.
7- Drira, N. and A. Benbadis (1985). Multiplication vēgētative du Palmer dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par rēvērsion, en culture in vitro, d'ēbauches florales de pieds femelles. J. Plant Physiol, 119: 227-235.
8- DeMason, D.A.; Stolte, K.W. and B.Tisserat (1983). Floral Development In (*Phoenix dactylifera* L.) Proceedings of The First Symposium On The Date Palm, March 23-25, 1982, Al-Hassa, Saudi Arabia.
9- Johanson, D. A. (1940). Plant Microtechnique. New York & London. McGraw-Hill Book Co., Inc.
10- Lo Schiavo F., Pitto L., Giuliano G., Torti G., Nutironchi V., Marazziti D., Vergara R., Orselli S. and Terzi M. 1989 DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. Theor. Appl. Genet, 77: 325-331.
11- Murashige, T. and F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures physiol. Plant, 15:473-497.
12- Schmülling, T.; S. Schäfer; and G. Romanov (1997). Cytokinins as regulators of gene expression. Physiol Plant, 100(3): 505.
13- Schwarz, O. J.; and R. M. Beaty (2000). Organogenesis In: Trigiano R.N and D.J. Gray (Eds). Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises. Second Edition, CRC Press. New York. USA, p: 125-138.
14- Skoog, F. and C.O. Miller (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro Symp. Soc. Exp. Biol, 9: 118-131.
15- Tisserat. B. (1981). Date palm tissue culture. Adv. Agric Tech. Reg. Ser. 17, USDA, ARS, p: 1-50.

HISTOLOGICAL STUDY OF INITIATION AND DEVELOPMENT OF ADVENTITIOUS BUDS FROM INFLORESCENCES OF TWO DATE PALM *(Phoenix dactylifera* L.) CULTIVARS CULTURED IN VITRO

S. M. Bader* M. A. Al-Khafaji H. S. Mohammed****

ABSTRACT

This histological study was conducted to illustrate the origin and the stages of initiation and development of adventitious buds from inflorescence explants cultured *in vitro* of two date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars Barhi and Maktom. Inflorescences were excised from adult trees at three different developmental stages, in addition samples from *in vitro* cultures for both cultivars after periods of time: 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 or 24 weeks intervals. These pieces were sectioning, staining and examined under the microscope. The results showed that the initial callus was originated from the meristemic tissue of the flower primordial in the early stage of development, while carpels and staminates primordial were the origin of the initial callus in the second and third stage. The study showed the initiation of adventitious buds directly from the parenchyma cells of the carpels primordial in the second stage of inflorescence development. These cells undergo dedifferentiation process and became meristematic before it redifferentiated and formed an apical dome surrounded with leaf primordia. These buds primordia were consequently developed to vegetative buds similar to those in the axillaries of plant leaves.

Part of PhD. thesis of the third author

*** State Board of Agric. Res.- Ministry of Agric. - Baghdad, Iraq.**
**** College of Agric.- Baghdad Univ.- Baghdad, Iraq.**